

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Композиция тела как индикатор метаболических изменений у мышей, полученных путем оплодотворения *in vitro*

М.В. Анисимова<sup>1</sup>, Л. Гон<sup>1</sup>, Г.В. Концевая<sup>1</sup>, А.В. Ромащенко<sup>1</sup>, Н.В. Хоцкин<sup>1</sup>, А.К. Станова<sup>1</sup>,  
Л.А. Герлинская<sup>1</sup>✉, М.П. Мошкин<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Томский государственный университет, кафедра зоологии позвоночных и экологии, Томск, Россия

✉ lgerlinskaya@gmail.com

**Аннотация.** Для выявления систем организма, подверженных эпигенетической трансформации при оплодотворении *in vitro* (IVF), были выполнены сравнительные морфофункциональные исследования половозрелых потомков мышей аутбредной линии CD1, свободных от патогенов (SPF-статус), полученных путем IVF (опыт) и при естественной зачатии (контроль). Исследования включали в себя оценку возрастной динамики массы и композиций тела, потребления и расходования энергии, а также глюкозный гомеостаз. Для нивелирования эффектов, обусловленных разным числом новорожденных в контроле и в опыте, у контрольных самок сокращали вдвое размеры выкармливаемых пометов. Самцы, полученные с использованием процедуры IVF, превосходили по массе тела контрольных самцов во всех возрастных группах. Как показал дисперсионный анализ с факторами «опыт/контроль», «пол», «возраст» (7, 10 и 20 недель), процедура IVF статистически значимо и однонаправленно влияла на композиционный состав тела. При этом IVF потомки превосходили контрольных особей по относительному содержанию жира, но проигрывали им по значениям тощей массы. Эффект взаимодействия факторов был статистически не значимым. У IVF потомков обоего пола были отмечены большие значения отношений жира к тощей массе (FLR). Поскольку жировая ткань вносит значительно меньший вклад в общее потребление энергии по сравнению с мышцами – основным компонентом тощей массы, то неудивительно, что при одинаковом уровне двигательной активности IVF потомки потребляли меньше корма, чем контрольные животные. При пересчете на один грамм массы тела эта разница достигала 19%. Одним из следствий пониженной утилизации энергетических субстратов IVF потомками является снижение их толерантности к нагрузке глюкозой. Интегральным критерием эффективности восстановления исходного уровня глюкозы служит площадь под кривой (AUC), величина которой была в 2.5 раза (самцы) и 3.2 раза (самки) выше у IVF потомков по сравнению с соответствующим контролем. Таким образом, совокупность собственных и литературных данных показывает увеличение риска метаболических нарушений у IVF потомков, что подтверждают эпидемиологические исследования сравнительно молодой когорты людей, рожденных с применением вспомогательных репродуктивных технологий. Ключевые слова: фертилизация *in vitro*; половозрелые потомки; эпигенетическая трансформация; композиция тела; потребление корма; глюкозотолерантность.

**Для цитирования:** Анисимова М.В., Гон Л., Концевая Г.В., Ромащенко А.В., Хоцкин Н.В., Станова А.К., Герлинская Л.А., Мошкин М.П. Композиция тела как индикатор метаболических изменений у мышей, полученных путем оплодотворения *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(4):357-365. DOI 10.18699/VJGB-23-43

## Body composition as an indicator of metabolic changes in mice obtained by *in vitro* fertilization

M.V. Anisimova<sup>1</sup>, Yanli Gon<sup>1</sup>, G.V. Kontsevaya<sup>1</sup>, A.V. Romashchenko<sup>1</sup>, N.V. Khotskin<sup>1</sup>, A.K. Stanova<sup>1</sup>,  
L.A. Gerlinskaya<sup>1</sup>✉, M.P. Moshkin<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Tomsk State University, Department of Vertebrate Zoology and Ecology, Tomsk, Russia

✉ lgerlinskaya@gmail.com

**Abstract.** To identify body systems subject to epigenetic transformation during *in vitro* fertilization (IVF), comparative morphological and functional studies were performed on sexually mature offspring of outbred CD1 mice, specific-pathogen-free (SPF), obtained by IVF (experiment) and natural conception (control). The studies included assessment of age-related changes in body weight and composition, energy intake and expenditure, and glucose homeostasis. To level the effects caused by the different number of newborns in the control and in the experiment, the size of the fed litters was halved in the control females. Males obtained using the IVF procedure were superior in body weight compared to control males in all age groups. As was shown by analysis of variance with experiment/control factors, gender, age (7, 10 and 20 weeks), the IVF procedure had a statistically significant and unidirectional effect on body composition. At the same time, IVF offspring outperformed control individuals in relative fat content, but were behind in terms of lean mass. The effect of the interaction of factors was not statistically significant. IVF offspring of both sexes had higher fat to lean mass ratios (FLR). Since adipose tissue contributes significantly less to total energy intake compared to muscle, the

main component of lean mass, it is not surprising that at the same level of IVF locomotor activity offspring consumed less food than controls. When converted to one gram of body weight, this difference reached 19 %. One of the consequences of reduced utilization of IVF energy substrates by offspring is a decrease in their tolerance to glucose loading. The integral criterion for the effectiveness of restoring the initial glucose level is the area under the curve (AUC), the value of which was 2.5 (males) and 3.2 (females) times higher in IVF offspring compared to the corresponding control. Thus, the totality of our original and literature data shows an increase in the risk of metabolic disorders in IVF offspring, which is confirmed by epidemiological studies of a relatively young cohort of people born using assisted reproductive technologies.

Key words: *in vitro* fertilization; mature offspring; epigenetic transformation; body composition; feed consumption; glucose tolerance.

**For citation:** Anisimova M.V., Gon Yanli, Kontsevaya G.V., Romashchenko A.V., Khotskin N.V., Stanova A.K., Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P. Body composition as an indicator of metabolic changes in mice obtained by *in vitro* fertilization. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(4):357-365. DOI 10.18699/VJGB-23-43

## Введение

Одной из цивилизационных проблем, значимо влияющих на здоровье новых поколений, является ширящееся распространение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), включающих экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), в том числе с помощью интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI), культивирование преимплантационных эмбрионов *in vitro* и пересадку эмбрионов суррогатным матерям. За 44 года, прошедших после первой удачной ЭКО-беременности, число людей, зачатых *in vitro*, превысило 10 миллионов и составляет в развитых странах около 2 % от общего числа новорожденных (Wyns et al., 2022). В России их число превышает 130 тысяч, из них 90 тысяч родились за последние пять лет, а количество удачных беременностей с использованием ВРТ выросло к настоящему времени примерно в три раза (Регистр ВРТ, 2019).

Несмотря на молодость поколения людей, рожденных с помощью ВРТ, в этой группе потомков отмечается более высокий риск диабета, нарушений обмена веществ, артериальной гипертензии, нейропсихических расстройств по сравнению с наблюдаемыми в одновозрастных группах потомков естественных зачатий (Hart, Norman, 2013; Hyaretian et al., 2014; Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018; Halliday et al., 2019). Эти результаты позволяют прогнозировать более быстрое развитие возрастных патологий, которое может вырасти в реальную проблему здравоохранения. По данным специализированных клиник, к процедуре ЭКО прибегают не только пары, в которых невозможность зачатия ребенка обусловлена возрастом одного или обоих партнеров, но и пациенты с отклонениями здоровья, в частности с избыточным весом, нарушениями психоэмоционального статуса и другими заболеваниями (Cauldwell et al., 2017; Farquhar et al., 2019). Поэтому, опираясь только на клинические наблюдения, трудно дифференцировать вклад в потенциальные нарушения здоровья самой процедуры ЭКО и генетико-физиологических особенностей родителей.

Наиболее адекватным подходом к оценке фенотипических последствий ЭКО и ВРТ являются экспериментальные исследования, выполняемые в контролируемых условиях на стандартизированных лабораторных животных. Именно эксперимент может раскрыть *pros and cons* оплодотворения *in vitro* (IVF) в решении демографических проблем современного общества. Следует отметить, что имеющиеся в литературе экспериментальные данные под-

тверждают фенотипическую значимость оплодотворения *in vitro* (Roy et al., 2017; La Rovere et al., 2019). Один из активно разрабатываемых аспектов фенотипической модуляции потомков, рожденных с помощью ВРТ, относится к увеличению рисков патологий, связанных с нарушениями обмена веществ (Heber, Ptak, 2021). В экспериментах на лабораторных мышах получены доказательства самостоятельной роли IVF в формировании метаболического синдрома и ожирения (Feuer et al., 2014), композиции тела (Sjöblom et al., 2005), а также изменений углеводного гомеостаза и предрасположенности к сахарному диабету (Scott et al., 2010). Однако эти эффекты IVF подтверждены не во всех работах и варьируют в зависимости от пола животных и условий развития эмбрионов вне материнского организма (Donjacour et al., 2014). При этом вне поля зрения остается вопрос ключевых факторов, определяющих проявления метаболического синдрома у взрослых потомков, полученных с помощью оплодотворения *in vitro*.

Метаболический синдром представляет собой сочетание гипергликемии, абдоминального ожирения, дислипидемии и гипертонии, а их проявление обусловлено особенностями пищевого поведения, физической активности и количеством потребляемой пищи (Sousa, Norman, 2016). Важнейшим фактором, приводящим к развитию метаболического синдрома, является изменение баланса между затратами энергии и ее компенсации за счет пищевых калорий. Кроме того, накопление жира определяется не только объемом потребленного корма, но и его распределением в суточном цикле (Gill, Panda, 2015). Вместе с тем анализ пищевого поведения мышей, полученных путем IVF, встречается в единичных работах и ограничивается лишь оценкой суточного потребления корма, без анализа циркадной динамики и без сопоставления с уровнем двигательной активности (Feuer et al., 2014).

Поскольку вышеперечисленные отклонения индивидуального развития носят взаимосвязанный характер, принципиально важно исследовать их комплексно в рамках единого эксперимента. Однако эти работы, как правило, ограничиваются изучением отдельных фенотипических характеристик на разных этапах индивидуального развития, что затрудняет анализ причинно-следственных связей между последовательными онтогенетическими событиями.

В нашей работе мы исследовали влияние ВРТ на формирование взаимозависимостей показателей суточной динамики активности, потребления корма, гомеостаза

глюкозы и композиционного состава тела, связанных с риском развития метаболического синдрома у естественно зачатых и полученных путем IVF половозрелых потомков мышей линии CD1. Мыши линии CD1 не имеют своего уникального гаплотипа MHC (Marín et al., 2014), и это обстоятельство позволяет исключить влияние MHC различных гаплотипов эмбрионов и вынашивающей матери на развитие эмбрионов в период беременности и, как следствие, на фенотип взрослых потомков (Gerlinskaya, Evsikov, 2001; Rapacz-Leonard et al., 2014). Мы показали, что полученные с помощью IVF потомки линии CD1 характеризуются избыточной массой тела, которая сочетается с увеличением относительной доли жира и пониженной толерантностью к нагрузке глюкозой.

### Материалы и методы

Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ ИЦиГ СО РАН на свободных от видоспецифических патогенов (SPF статус) мышах аутбредной линии CD1. Соответствие SPF статусу подтверждено анализом патогенов согласно списку Европейской ассоциации лабораторного животноводства (FELASA).

Для содержания животных использовали индивидуально вентилируемые клетки – OptiMice (США). Контролируемые условия среды имели следующие параметры: фотопериод 14С:10Т, температура 22–24 °С, влажность 40–50 %. Плавное выключение света начиналось с 16:00 ч местного времени. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные березовые гранулы (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм (SNIFF, Германия) и воду давали без ограничений. Корм и подстилку предоставляли животным после автоклавирования (121 °С).

**Экспериментальные группы.** Группа IVF – самцы и самки, полученные с помощью *in vitro* оплодотворения (IVF), культивирования и эмбриональных пересадок; группа «контроль» – самцы и самки, полученные в результате естественного спаривания.

**Получение потомков: *in vitro* оплодотворение, культивирование и эмбриональные пересадки.** Процедуры IVF, культивирование эмбрионов и эмбриональные пересадки проводились в соответствии с методом, описанным ранее (Kontsevaya et al., 2021). Ооциты для IVF получали от самок CD1 мышей после суперовуляции, выполненной путем внутрибрюшинного введения 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (PMSG) (Intervet International, Нидерланды) и последующего с интервалом 48 ч введения 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (хорулон) (Intervet International, Нидерланды). Кумулюс-ооцитные комплексы, собранные из ампулы яйцевода через 17–18 ч после инъекции ХГЧ, помещали в каплю (200 мкл) среды HTF (Human Tubal Fluid, Irvine Scientific, США) для оплодотворения. Для получения сперматозоидов каудальный отдел эпидидимиса помещали в HTF среду и после инкубации (1 ч) каплю 3–5 мкл, содержащую сперматозоиды, добавляли к ооцитам и инкубировали в течение 4–5 ч. Оплодотворенные ооциты промывали четырьмя каплями среды HTF и культивировали 72 ч в 60 мкл среды KSOM по 8–12 эмбрионов в капле под минеральным маслом (Sigma), при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> до стадии бластоцист. Эф-

фективность развития эмбрионов после IVF составила 75.5±2.86 % на стадии двух клеток и 70.6±4.64 % от стадии двух клеток до бластоцист.

Бластоцисты пересаживали псевдобеременным самкам CD1 на стадии 2.5 суток псевдобеременности (Kontsevaya et al., 2021). Псевдобеременность индуцировали спариванием самок с вазэктомированными самцами той же линии. Окклюзионную вазэктомию самцов проводили термическим прижиганием семявыносящих протоков не менее чем за две недели до спариваний. Хирургические процедуры выполнялись под общей анестезией: Домитор (Orion Pharma, Финляндия) – 15 мкг/100 г массы тела, Золетил (Virbac, Франция) – 3 мг/100 г массы тела, внутривенно. На следующее утро после спариваний самок осматривали и при наличии вагинальной пробки отсаживали в отдельные клетки. Псевдобеременным самкам ( $n = 17$ ) хирургическим путем под газовой анестезией (Aerrane, Baxter Healthcare Corp., США) переносили по 12 бластоцист в левый яйцевод. После эмбриональных пересадок самок помещали в отдельные клетки до родов. Поскольку, как показано ранее, хирургические процедуры, выполняемые при эмбриональных пересадках (наркогизация и введение культуральной среды в матку), не влияли на течение беременности и гормональный фон (Gerlinskaya, Evsikov, 2001), контрольных самцов получали путем естественных спариваний.

После процедур IVF и эмбриональных пересадок 13 самок (76.5 %) родили; все новорожденные потомки были выкормлены без потерь. Потомки после материнского вскармливания (3 недели) были отсажены от матерей и далее содержались однополыми группами по 5 особей в каждой клетке. Среднее число выкормленных потомков, полученных с помощью IVF, составило 3.6±0.24, что было существенно ниже по сравнению с 12.5±0.58 при естественной беременности. Уменьшение размера пометов обусловлено подсадкой бластоцист только в один рог матки, тогда как при естественной беременности плоды развиваются в двух рогах. В свою очередь размер помета влияет на материнское поведение и развитие потомков (Enes-Marques, Giusti-Paiva, 2018). Для нивелирования эффектов числа выкармливаемых потомков, у самок контрольной группы изымали часть новорожденных и сокращали число выкармливаемых потомков до 4–5 особей в помете. Были исследованы потомки из 13 IVF пометов и 8 редуцированных контрольных пометов (табл. 1).

**Массу и композиционный состав тела** потомков определяли в возрасте 7–8, 10–11 и 19–20 недель. Количественную оценку жировой и тощей массы выполняли с помощью низкопольного ЯМР (ядерный магнитный резонанс) спектрометра EchoMRI (США).

**Двигательную активность и потребление корма** измеряли у самцов и самок контрольной и экспериментальной групп в возрасте 11–12 недель. Животных рассаживали по одной особи в клетки установки Phenomaster (TSE, Германия). После двухдневного привыкания проводили измерения пройденного пути (спонтанная двигательная активность), потребления воды и корма в течение трех суток. При анализе циркадных ритмов двигательной и пищевой активности значения анализируемых показателей суммировали с интервалом 1 ч. Для межгрупповых

**Таблица 1.** Исследованные потомки

Группа	Пол	Число исследованных потомков			
		Масса тела	Композиционный состав тела	Потребление корма, двигательная активность	Глюкозотолерантный тест
IVF	Самцы	21	14	15	16
	Самки	18	15	13	11
Контроль	Самцы	23	15	11	8
	Самки	14	10	11	8

сравнений двигательной активности, потребления корма и воды использовали суммарные величины за трое суток наблюдений.

**Глюкозотолерантный тест (ГТТ)** выполняли по стандартной методике на самцах и самках контрольной и экспериментальной групп в возрасте 10–11 недель. За 16 ч до инъекций глюкозы из клеток содержания мышей извлекали кормушку. Глюкозу («ПанЭко», Россия) вводили внутривентриально из расчета 10 мкл 20 % глюкозы на 1 г массы мыши. Кровь брали из кончика хвоста в пяти временных точках: 0 – базовый уровень до внутривентриального введения раствора глюкозы, 1 – через 15 мин, 2 – через 30 мин, 3 – через 60 мин, 4 – через 120 мин после внутривентриального введения раствора глюкозы. Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра Contour TS (Baier, Швейцария). В качестве интегрального показателя ГТТ рассчитывали методом численного интегрирования площадь под кривой прироста от базового уровня концентрации глюкозы (average under curve – AUC).

**Статистический анализ** начинали с оценки характера распределения эмпирических данных. Согласно критерию Колмогорова–Смирнова, все вариационные ряды анализируемых признаков соответствовали нормальному распределению. Поэтому для определения эффектов экспериментальной группы, возраста и пола использовали двух- или трехфакторный дисперсионный анализ и дисперсионный анализ с повторными измерениями. Сравнения двух средних значений проводили с помощью критерия Стьюдента (*t*-тест). Данные представлены в виде средних и их ошибок (mean ± SE).

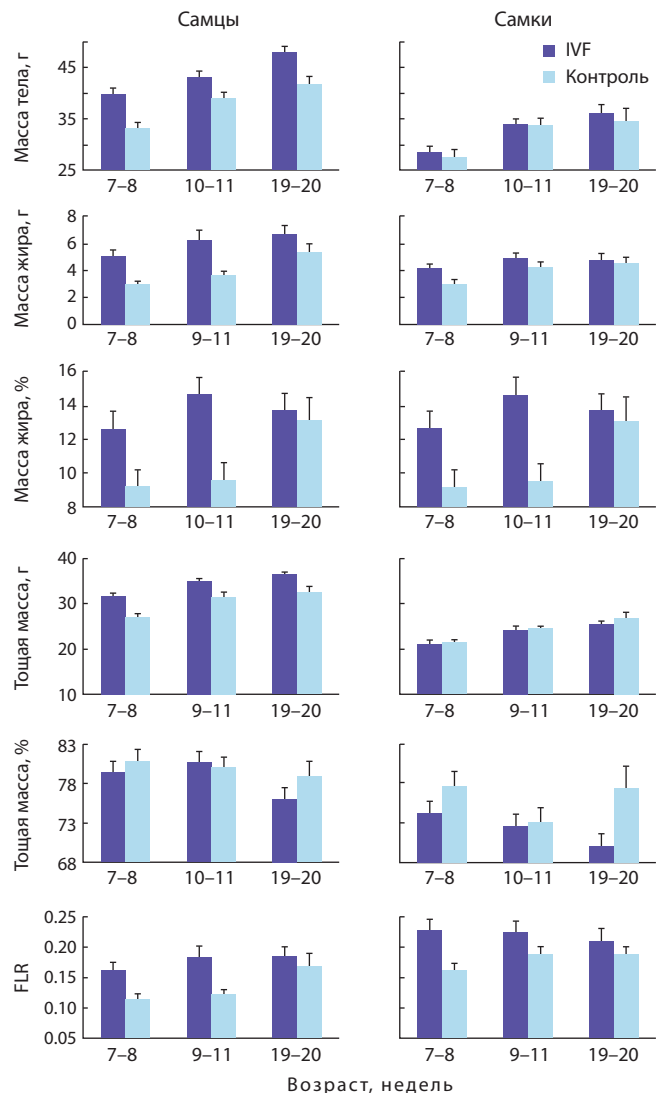
## Результаты

### Масса и композиционный состав тела

Дисперсионный анализ с факторами «опыт/контроль», «пол» и «возраст» (7–8, 10–11 и 19–20 недель) показал, что процедура IVF статистически значимо влияла на массу и композиционный состав тела (табл. 2, рис. 1).

Взаимодействия факторов не установлено ни для одного из проанализированных признаков, что свидетельствует об однонаправленном влиянии оплодотворения *in vitro* в разных половозрастных группах. Анализ эффектов IVF, выполненный отдельно для самцов и самок, выявил статистически значимые различия по массе тела между контролем и опытом только у самцов, у которых во всех возрастных группах (от 3 до 20 недель) IVF потомки превосходили по массе тела (43.7 ± 0.7 г) контрольных животных (38.0 ± 0.8 г). Статистическую значимость IVF под-

тверждает двухфакторный дисперсионный анализ с факторами «контроль/опыт» и «возраст» ( $F_{1,77} = 28.6, p < 0.001$ ). Этот же прием был применен для анализа влияния IVF на композицию тела у самцов и самок. Общее содержание жира и тощая масса были выше у IVF самцов (6.0 ± 0.3 и 34.2 ± 0.4 г соответственно), чем у контрольных (4.0 ± 0.3 и 30.3 ± 0.4 г;  $F_{1,77} = 20.5, p < 0.001$  и  $F_{1,77} = 40.0, p < 0.001$ ).



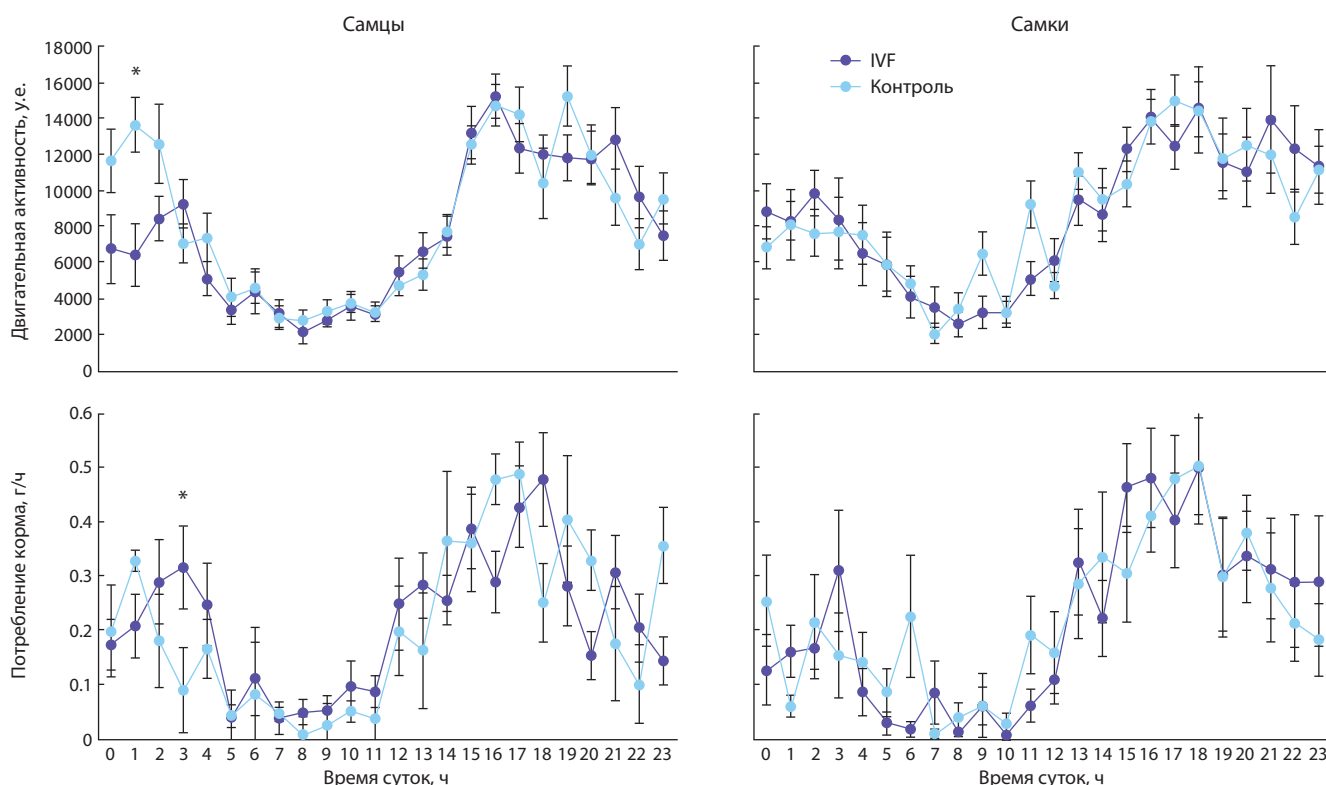
**Рис. 1.** Масса и композиция тела в группах IVF и контроль в разном возрасте.

FLR – отношение жира (fat) к тощей массе (lean).

**Таблица 2.** Влияние возраста, пола и экспериментальной группы на массу тела и его композиционный состав (двухфакторный дисперсионный анализ)

Показатель	Возраст		Пол		Группа	
	$F_{1,138}$	$p$	$F_{1,138}$	$p$	$F_{1,138}$	$p$
Масса тела, г	34.97	<0.001	114.69	<0.001	16.96	<0.001
Масса жира, г	9.614	<0.001	0.733	=0.393	20.96	<0.001
Масса жира, %	1.10	=0.339	14.66	<0.001	13.96	<0.001
Тощая масса, г	37.25	<0.001	290.79	<0.001	11.07	=0.001
Тощая масса, %	2.14	=0.121	29.17	<0.001	6.73	=0.011
FLR	1.47	=0.23	20.28	<0.001	15.71	<0.001

Примечание. Эффекты взаимодействия факторов были статистически недостоверными и поэтому не включены в таблицу.



**Рис. 2.** Суточная динамика двигательной активности и потребления корма у потомков, полученных естественным зачатием (контроль) или путем IVF.

\*  $p \leq 0.05$ , ANOVA with repeated measure:  $F_{1,16} = 5.06$  для двигательной активности и  $F_{1,16} = 5.16$  для потребления корма.

У самок IVF статистически значимо влияло только на содержание жира: IVF –  $5.1 \pm 0.2$  г, контроль –  $4.4 \pm 0.3$  г;  $F_{1,61} = 4.4$ ,  $p = 0.04$ .

Перечисленные выше эффекты отчасти обусловлены влиянием IVF на массу тела животных. Но межгрупповые различия (IVF vs контроль) сохранялись и при анализе относительных показателей композиций тела. Так, процентное содержание жира у IVF самцов ( $13.4 \pm 0.6$  %) и самок ( $15.7 \pm 0.5$  %) превышало значение у контрольных особей (самцы –  $10.6 \pm 0.7$  %;  $F_{1,77} = 10.5$ ,  $p = 0.002$ ; самки –  $13.6 \pm 0.8$  %;  $F_{1,61} = 4.7$ ,  $p = 0.03$ ). В отличие от жира, доля тощей массы была выше в контроле, но эффект IVF был статистически значимым только у самок: контроль –  $76.2 \pm 1.3$  %, IVF –  $72.4 \pm 0.9$  %;  $F_{1,61} = 5.8$ ,  $p = 0.02$ .

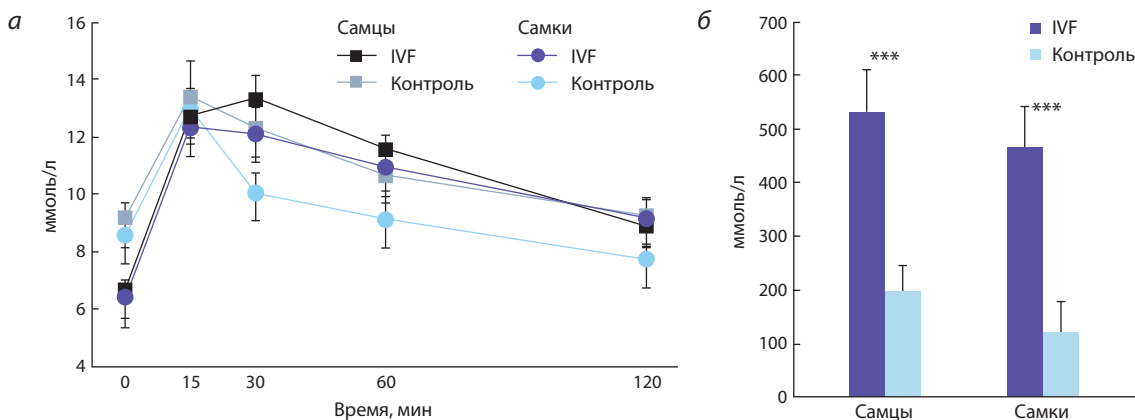
FLR также зависело от пола и экспериментальной группы. При этом самцы и самки, полученные путем оплодотворения *in vitro*, превосходили по FLR контрольных особей: самцы IVF –  $0.175 \pm 0.008$ , контроль –  $0.133 \pm 0.009$ ;  $F_{1,77} = 10.2$ ,  $p = 0.002$ ; самки IVF –  $0.221 \pm 0.009$ , контроль –  $0.180 \pm 0.014$ ;  $F_{1,61} = 6.1$ ,  $p = 0.016$ .

#### Двигательная активность и потребление корма

Мониторинг двигательной активности и потребления корма показал типичные для мышей суточные изменения исследуемых показателей (рис. 2). Статистически значимые различия между контрольной и экспериментальной группами были выявлены только у самцов во второй половине активного периода, т. е. от 00:00 до 04:00 ч (время местное).

**Таблица 3.** Влияние пола и экспериментальной группы на двигательную активность и потребление корма (двухфакторный дисперсионный анализ)

Фактор	df	Двигательная активность		Потребление корма/масса тела		Потребление корма/активность	
		F	p	F	p	F	p
Пол	1	6.45	=0.014	1.37	=0.25	11.84	<0.010
Группа	1	0.11	=0.74	5.16	=0.028	0.17	=0.68
Пол × группа	1	0.48	=0.49	0.03	=0.86	0.57	=0.45
Ошибка	46						



**Рис. 3.** Глюкозотолерантный тест: а – динамика концентрации глюкозы; б – AUC.

\*\*\*  $p < 0.001$  между экспериментальными и контрольными группами потомков (t-тест Стьюдента).

**Таблица 4.** Влияние пола и экспериментальной группы на базальный и максимальный уровни глюкозы и на AUC в глюкозотолерантном тесте (двухфакторный дисперсионный анализ)

Фактор	df	Базальная концентрация		Пиковая концентрация		AUC	
		F	p	F	p	F	p
Пол	1	0.78	=0.38	0.28	=0.60	0.66	=0.42
Группа	1	21.079	<0.001	0.65	=0.43	14.35	<0.001
Пол × группа	1	0.06	=0.81	0.00	=0.99	0.004	=0.95
Ошибка	34						

У контрольных особей отмечено увеличение активности, которая статистически значимо превосходила таковую у IVF потомков, в 01:00 ч. В свою очередь IVF потомки показывали большее, чем контрольные особи, потребление корма в 03:00 ч.

Дисперсионный анализ с факторами «опыт/контроль» и «пол» результатов трехсуточного мониторинга двигательной активности и потребления корма показал, что спонтанная двигательная активность не зависела от принадлежности животных к контрольной или экспериментальной (IVF) группе (табл. 3). Для потребления корма в пересчете на 1 г массы тела выявлено значимое влияние IVF, которое выражалось в том, что контрольные особи потребляли больше корма ( $0.630 \pm 0.037$  г/г,  $n = 26$ ), чем особи, полученные путем IVF ( $0.511 \pm 0.036$  г/г,  $n = 24$ ). Расход корма на единицу пройденного пути был одинаковым в контрольной и экспериментальной группах.

Отметим, что для исследуемых показателей был выявлен статистически значимый эффект пола. При этом самки демонстрировали большую спонтанную активность и большее потребление корма по сравнению с самцами. Но затраты корма на единицу пройденного пути у них были на 24 % меньше, чем у самцов. Статистическую значимость половых различий подтверждает дисперсионный анализ:  $F_{1,46} = 10.5, p = 0.0022$ .

#### Глюкозотолерантный тест

Базовая концентрация глюкозы (время 0 на рис. 3) у самцов и самок, полученных путем IVF, была достоверно ниже, чем в контроле (табл. 4). Максимальные значения глюкозы, зарегистрированные через 15 мин после инъекций, были одинаковыми у особей разного пола и разных экспериментальных групп. Суммарные отклонения концентрации глюкозы (AUC) существенно различались в

зависимости от принадлежности к экспериментальной группе (см. табл. 4). Они были статистически значимо выше у IVF потомков, чем в контроле (см. рис. 3).

## Обсуждение

Несмотря на выравнивание размеров выкармливаемых пометов в группах «контроль» и «эксперимент», самцы, полученные путем оплодотворения *in vitro*, превосходят по массе тела естественно зачатых особей во всех возрастных группах. Следует отметить, что позитивное влияние IVF на темпы роста самцов наблюдали и другие авторы (Van Montfoort et al., 2012; Donjacour et al., 2014; Narapareddy et al., 2021; Elhakeem et al., 2022), но этот эффект существенно зависит от условий развития эмбрионов вне материнского организма. При инкубации в среде с оптимизированным аминокислотным составом масса тела у половозрелых IVF самцов не отличается от контроля (Donjacour et al., 2014; Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018; Qin et al., 2021), а у самок даже превосходит таковую (Feuer et al., 2014).

В отличие от массы тела, влияние IVF на композиционный состав было статистически значимым и у самцов, и у самок. При этом общее и относительное (% от массы тела) содержание жира было выше у IVF потомков обоего пола. В свою очередь IVF самцы имели не только большую по сравнению с контрольными самцами массу тела; абсолютные значения тощей массы у них тоже были выше, чем у контрольных особей. При этом относительная тощая масса у контрольных особей превосходила таковую у потомков, полученных путем IVF, по крайней мере у самок. Одной из метаболически значимых характеристик композиционного состава тела является отношение общей массы жира к тощей массе (Seo et al., 2020; Liu et al., 2021). Потомки обоего пола, полученные путем IVF, превосходили по FLR контрольных особей: на 31.6 % (самцы) и на 22.8 % (самки).

Наиболее распространенной причиной индивидуальных вариаций накопления жира является изменение баланса между потреблением энергетических субстратов и их расходом, в частности на мышечную работу. В нашем исследовании не выявлено статистически значимых различий по уровню спонтанной активности между контрольными и IVF потомками. А потребление корма в пересчете на единицу массы тела у IVF потомков было ниже, чем у особей, полученных естественным путем. В экспериментальных и клинических исследованиях отмечается, что накопление жира возрастает при смещении основного приема пищи на окончание активной фазы суточного цикла (Gill, Panda, 2015; Panda, 2016; Wilkinson et al., 2020). Статистически значимое превышение потребления корма за 3 ч до завершения темного времени суток было отмечено у IVF самцов, которые превосходили по данному показателю контрольных особей. У самок контрольной и экспериментальной групп динамика потребления корма была одинаковой. Но большее по сравнению с контролем накопление жира характерно для IVF потомков обоего пола. Поэтому изменение суточного ритма потребления корма, имеющее место только у самцов, не может служить универсальным объяснением изменений композиционного состава тела у потомков, полученных методом IVF.

Наряду с балансом двигательной активности и потребления корма, не меньшее значение для накопления жира имеет скорость утилизации энергетических субстратов. Показателем, отражающим скорость утилизации энергетических субстратов, может служить падение концентрации глюкозы в крови при стандартной углеводной нагрузке. Интегральным критерием эффективности восстановления исходного уровня глюкозы является площадь под кривой (AUC), величина которой была в 2.5 раза (самцы) и в 3.2 раза (самки) выше у IVF потомков по сравнению с соответствующим контролем.

Итак, мыши, полученные с помощью IVF, отличаются от контрольных особей большим накоплением жира в сочетании с меньшим потреблением корма и пониженной толерантностью к нагрузке глюкозой. Эта совокупность факторов хорошо согласуется с данными литературы, согласно которым особи с меньшим уровнем базального энергообмена (basal metabolic rate) характеризуются большей предрасположенностью к сахарному диабету (Masiak et al., 2020). Роль композиционного состава тела может выступать в качестве одного из значимых факторов наблюдаемых метаболических изменений. Здесь обращает на себя внимание выявленное во всех половозрастных группах животных увеличение отношения жира к тощей массе. Как известно, жировая ткань вносит минимальный вклад в общее потребление энергии, которая во многом определяется мышцами (Seo et al., 2020; Liu et al., 2021) – основным компонентом тощей массы.

В целом полученные результаты показывают, что значимое увеличение риска развития метаболического синдрома у потомков, полученных с помощью IVF, не зависит от количества потребляемого корма и двигательной активности. У самцов накопление жира может быть объяснено нарушением суточного ритма потребления корма и снижением скорости утилизации глюкозы. У самок основная причина накопления жира и, как следствие, риска развития метаболического синдрома может быть связана с изменениями в метаболических путях, обеспечивающих эффективность утилизации энергетических субстратов. На эту причину указывает наблюдаемое существенное снижение толерантности к глюкозе.

Следует отметить, что наши результаты позволяют рассмотреть возможные пути развития метаболического синдрома, но не раскрывают его механизмов, которые могут быть обусловлены многими факторами, связанными с особенностями воздействий на разных этапах онтогенеза потомков при использовании комплекса ВРТ. В частности, состав культуральной среды (Khosla et al., 2001; Sjöblom et al., 2005; Zandstra et al., 2018), содержание кислорода в газовой среде и pH культуральной среды (Kelley, Gardner, 2017; Ng et al., 2018), продолжительность культивирования эмбрионов (Johnson, 2019) и другие факторы, связанные с процедурами хирургической трансфекции эмбрионов (Рожкова и др., 2017), а также иммуногенетические различия матери и плода (Gerlinskaya et al., 2019) влияют на фенотип потомков. Однако важно подчеркнуть, что эти работы ограничиваются изучением отдельных этапов индивидуального развития, что затрудняет анализ причинно-следственных связей между последовательными онтогенетическими событиями. Период онтогенеза,

включающий первое клеточное деление и развитие преимплантационных зародышей, является критическим и совпадает с глобальным перепрограммированием эпигенома и установлением эпигенетических изменений, которые сохраняются во взрослом возрасте. Вполне вероятно, что эпигенетические модификации, возникающие из-за воздействия процедур, используемых при получении потомков с помощью ВРТ, могут играть центральную роль в дестабилизации пренатального развития и, как следствие, в увеличении риска метаболического синдрома.

Одним из критериев, используемых для оценки дестабилизации развития, является флуктуирующая асимметрия (Dongen, 2006). Реалистичность использования данного критерия как индикатора дестабилизации развития подтверждается клиническими наблюдениями, показывающими, что флуктуирующая асимметрия отпечатков пальцев на левой и правой руке с высокой степенью достоверности ассоциирована с предрасположенностью к диабету (Morris et al., 2012, 2016; Yohannes et al., 2015).

## Заклучение

Таким образом, совокупность собственных и литературных данных позволяет очертить круг обусловленных IVF взаимосвязанных событий, включающий в себя дестабилизацию развития, комплекс метаболических изменений и повышение риска диабета. Однако механистическая конкретизация последствий IVF требует дальнейших исследований, в том числе расширенного изучения взаимоотношений эпигенетических модификаций, флуктуирующей асимметрии и регуляции обмена веществ. Актуальность таких исследований, судя по данным обзора (Norgman et al., 2020), неуклонно растет по мере взросления когорты людей, рожденных с помощью вспомогательных репродуктивных технологий.

## Список литературы / References

Регистр ВРТ: Отчет за 2019 год. Российская Ассоциация Репродукции Человека. 2019. [https://www.rahr.ru/d\\_registr\\_otchet/RegistrART2019.pdf](https://www.rahr.ru/d_registr_otchet/RegistrART2019.pdf).  
[Russian Association of Human Reproduction. National Register of ART of 2019. [https://www.rahr.ru/d\\_registr\\_otchet/RegistrART2019.pdf](https://www.rahr.ru/d_registr_otchet/RegistrART2019.pdf). (in Russian)]

Рожкова И.Н., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Петрова О.М., Брусенцев Е.Ю., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Отсроченные эффекты хирургического воздействия, перенесенного матерью в период ранней беременности, на артериальное давление и поведение потомков у крыс линии OXYS. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(8):937-942. DOI 10.18699/VJ17.316.  
[Rozhkova I.N., Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M., Brusentsev E.Y., Naprimеров V.A., Amstislavsky S.Y. Long-term effects of maternal exposure to surgical stress at the earliest stage of pregnancy on blood pressure and behavior in offspring of OXYS rats. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(8):937-942. DOI 10.18699/VJ17.316. (in Russian)]

Cauldwell M., Patel R.R., Steer P.J., Swan L., Norman-Taylor J., Gatzoulis M., Johnson M.R. Managing subfertility in patients with heart disease: what are the choices? *Am. Heart. J.* 2017;187:29-36. DOI 10.1016/j.ahj.2017.02.007.

Dongen S.V. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *J. Evol. Biol.* 2006; 19(6):1727-1743. DOI 10.1111/j.1420-9101.2006.01175.x.

Donjacour A., Liu X., Lin W., Simbulan R., Rinaud P.F. In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. *Biol. Reprod.* 2014;90(4):80. DOI 10.1095/biolreprod.113.113134.

Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: what do animals tell us? *Mol. Rep. Dev.* 2018;85(4):348-368. DOI 10.1002/mrd.22970.

Elhakeem A., Taylor A.E., Inskip H.M., Huang J., Tafflet M., Vrijkotte T.G.M., Nelson S.M., Andersen A.-M.N., Magnus M.C., Lawlor D.A. Association of assisted reproductive technology with offspring growth and adiposity from infancy to early adulthood. *JAMA Netw. Open.* 2022;5(7):e2222106. DOI 10.1001/jamanetworkopen.2022.22106.

Enes-Marques S., Giusti-Paiva A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *J. Physiol. Sci.* 2018;68(6):789-798. DOI 10.1007/s12576-018-0594-8.

Farquhar C.M., Bhattacharya S., Repping S., Mastenbroek S., Kamath M.S., Marjoribanks J., Boivin J. Female subfertility. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2019;5(1):7. DOI 10.1038/s41572-018-0058-8.

Feuer S.K., Liu X., Donjacour A., Lin W., Simbulan R.K., Giritharan G., Piane L.D., Kolahi K., Ameri K., Maltepe E., Rinaudo H.F. Use of a mouse in vitro fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. *Endocrinology.* 2014;155(5):1956-1969. DOI 10.1210/en.2013-2081.

Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Influence of genetic dissimilarity of mother and fetus on progesterone concentrations in pregnant mice and adaptive features of offspring. *Reproduction.* 2001;121(3):409-417. DOI 10.1530/rep.0.1210409.

Gerlinskaya L.A., Litvinova E.A., Kontsevaya G.V., Feofanova N.A., Achasova K.M., Anisimova M.V., Maslennikova S.O., Zolotykh M.A., Moshkin Y.M., Moshkin M.P. Phenotypic variations in transferred progeny due to genotype of surrogate mother. *Mol. Hum. Reprod.* 2019;25(2):88-99. DOI 10.1093/molehr/gay052.

Gill S., Panda S. A smartphone app reveals erratic diurnal eating patterns in humans that can be modulated for health benefits. *Cell Metab.* 2015;3:789-798. DOI 10.1016/j.cmet.2015.09.005.

Halliday J., Lewis S., Kennedy J., Burgner D.P., Juonala M., Hammarberg K., Amor D.J., Doyle L.W., Saffery R., Ranganathan S., Welsh L., Cheung M., McBain J., Hearps S.J.C., McLachlan R. Health of adults aged 22 to 35 years conceived by assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* 2019;112(1):130-139. DOI 10.1016/j.fertnstert.2019.03.001.

Hart R., Norman R.J. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I – General health outcomes. *Hum. Reprod. Update.* 2013;19(3):232-243. DOI 10.1093/humupd/dms062.

Heber M.F., Ptak G.V. The effects of assisted reproduction technologies on metabolic health and disease. *Biol. Reprod.* 2021;104(4):734-744. DOI 10.1093/biolre/iaaa224.

Hyrapietian M., Loucaides E.M., Sutcliffe A.G. Health and disease in children born after assistive reproductive therapies (ART). *J. Reprod. Immunol.* 2014;106:21-26. DOI 10.1016/j.jri.2014.08.001.

Johnson M.H. A short history of in vitro fertilization (IVF). *Int. J. Dev. Biol.* 2019;63(3-4-5):83-92. DOI 10.1387/ijdb.180364mj.

Kelley R.L., Gardner D.K. In vitro culture of individual mouse preimplantation embryos: the role of embryo density, microwells, oxygen, timing and conditioned media. *Reprod. Biomed. Online.* 2017; 34(5):441-454. DOI 10.1016/j.rbmo.2017.02.001.

Khosla S., Dean W., Brown D., Reik W., Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol. Reprod.* 2001;64(3):918-926. DOI 10.1095/biolreprod64.3.918.

Kontsevaya G.V., Gerlinskaya L.A., Moshkin Y.M., Anisimova M.V., Stanova A.K., Babochkina T.I., Moshkin M.P. The effects of sperm and seminal fluid of immunized male mice on in vitro fertilization and surrogate mother-embryo interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(19):10650. DOI org/10.3390/ijms221910650.



- La Rovere M., Franzago M., Stuppia L. Epigenetics and neurological disorders in ART. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(17):E4169. DOI 10.3390/ijms20174169.
- Liu D., Zhong J., Ruan Y., Zhang Z., Sun J., Chen H. The association between fat-to-muscle ratio and metabolic disorders in type 2 diabetes. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2021;13:129. DOI 10.1186/s13098-021-00748-y.
- Maciak S., Sawicka D., Sadowska A., Prokopiuk S., Buczyńska S., Bartoszewicz M., Niklińska G., Konarzewski M., Car H. Low basal metabolic rate as a risk factor for development of insulin resistance and type 2 diabetes. *BMJ Open Diab. Res. Care.* 2020;8:e001381. DOI 10.1136/bmjdr-2020-001381.
- Marín N., Mecha M., Espejo C., Mestre L., Eixarch H., Montalban X., Álvarez-Cermeño J.C., Guaza C., Villar L.M. Regulatory lymphocytes are key factors in MHC-independent resistance to EAE. *J. Immunol. Res.* 2014;2014:156380. DOI 10.1155/2014/156380.
- Morris M.R., Ludwar B.C., Swingle E., Mamo M.N., Shubrook J.H. A new method to assess asymmetry in fingerprints could be used as an early indicator of type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016;10(4):864-871. DOI 10.1177/1932296816629984.
- Morris M.R., Rios-Cardenas O., Lyons S., Tudor M.S., Bono L. Fluctuating asymmetry indicates optimization of growth rate over developmental stability. *Funct. Ecol.* 2012;26(3):723-731. DOI 10.1111/j.1365-2435.2012.01983.x.
- Narapareddy L., Rhon-Calderon E.A., Vrooman L.A., Baeza J., Nguyen D.K., Mesaros C., Lan Y., Garcia B.A., Schultz R.M., Bartolomei M.S. Sex-specific effects of in vitro fertilization on adult metabolic outcomes and hepatic transcriptome and proteome in mouse. *FASEB J.* 2021;35(4):e21523. DOI 10.1096/fj.202002744R.
- Ng K.Y.B., Mingels R., Morgan H., Macklon N., Cheong Y. *In vivo* oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum. Reprod. Update.* 2018;24(1):15-34. DOI 10.1093/humupd/dmx028.
- Norman E., Petzold M., Clausen T.D., Henningsen A.-K., Opdahl S., Pinborg A., Rosengren A., Bergh C., Wennerholm U. Type 1 diabetes in children born after assisted reproductive technology: a register-based national cohort study. *Hum. Reprod.* 2020;35(1):221-231. DOI 10.1093/humrep/dez227.
- Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science.* 2016;354(6315):1008-1015. DOI 10.1126/science.aah4967.
- Qin N., Zhou Z., Zhao W., Zou K., Shi W., Yu C., Huang H. Abnormal glucose metabolism in male mice offspring conceived by in vitro fertilization and frozen-thawed embryo transfer. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:637781. DOI 10.3389/fcell.2021.637781.
- Rapacz-Leonard A., Dąbrowska M., Janowski T. Major histocompatibility complex I mediates immunological tolerance of the trophoblast during pregnancy and may mediate rejection during parturition. *Mediators Inflamm.* 2014;214:579279. DOI 10.1155/2014/579279.
- Roy M.C., Dupras C., Ravitsky V. The epigenetic effects of assisted reproductive technologies: ethical considerations. *J. Dev. Orig. Health. Dis.* 2017;8(4):436-442. DOI 10.1017/S2040174417000344.
- Scott K.A., Yamazaki Y., Yamamoto M., Lin Y., Melhorn S.J., Krause E.G., Woods S.C., Yanagimachi R., Sakai R.R., Tamashiro K. Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2010;83(2):220-227. DOI 10.1095/biolreprod.109.082826.
- Seo Y.-G., Song H.J., Song Y.R. Fat-to-muscle ratio as a predictor of insulin resistance and metabolic syndrome in Korean adults. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;11(3):710-725. DOI 10.1002/jcsm.12548.
- Sjöblom C., Roberts C.T., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology.* 2005;146(5):2142-2153. DOI 10.1210/en.2004-1260.
- Sousa S.M., Norman R.J. Metabolic syndrome, diet and exercise. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2016;37:140-151. DOI 10.1016/j.bpobgyn.2016.01.006.
- van Montfoort A.P.A., Hanssen L.L.P., de Sutter P., Viville S., Geraedts J.P.M., de Boer P. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. *Hum. Reprod. Update.* 2012;18(2):171-197. DOI 10.1093/humupd/dmr047.
- Wilkinson M.J., Manoogian E.N.C., Zadorian A., Lo H., Fakhouri S., Shoghi A., Wang X., Fleischer J.G., Navlakha S., Panda S., Taub P.R. Ten-hour time-restricted eating reduces weight, blood pressure, and atherogenic lipids in patients with metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2020;31(1):92-104.e5. DOI 10.1016/j.cmet.2019.11.004.
- Wyns C., De Geyter C., Calhaz-Jorge C., Kupka M.S., Wyns C., Mocanu E., Motrenko T., Scaravelli G., Smeenk J., Vidakovic S., Goossens V. ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE. *Hum. Reprod. Open.* 2022;2022(3):hoac022. DOI 10.1093/hropen/hoac022.
- Yohannes S., Alebie G., Assefa L. Dermatoglyphics in type 2 diabetes with implications on gene linkage or early developmental noise: past perspectives. *Current Trends Future Prospects.* 2015;3(1D):297-305.
- Zandstra H., Brentjens L.B.P.M., Spauwen B., Touwslager R.N.H., Bons J.A.P., Mulder A.L., Smits L.J.M., van der Hoeven M.A.H.B.M., van Golde R.J.T., Evers J.L.H., Dumoulin J.C.M., van Montfoort A.P.A. Association of culture medium with growth, weight and cardiovascular development of IVF children at the age of 9 years. *Hum. Reprod.* 2018;33(09):1645-1656. DOI 10.1093/humrep/dey246.

#### ORCID ID

M.V. Anisimova [orcid.org/0000-0003-1522-9433](https://orcid.org/0000-0003-1522-9433)  
A.V. Romashchenko [orcid.org/0000-0002-0674-0574](https://orcid.org/0000-0002-0674-0574)  
L.A. Gerlinskaya [orcid.org/0000-0002-8118-1362](https://orcid.org/0000-0002-8118-1362)  
M.P. Moshkin [orcid.org/0000-0002-5388-2946](https://orcid.org/0000-0002-5388-2946)

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке РФФ, грант № 23-14-00179. В работе были использованы ресурсы ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, который поддерживается бюджетными проектами АААА-А17-17072710029-7 и 0259-2019-0004.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.05.2023. После доработки 05.06.2023. Принята к публикации 09.06.2023.